

Universidade de Lisboa

Faculdade de Medicina Dentária



**COMPORTAMENTO QUANTO À  
INFILTRAÇÃO BACTERIANA DE UM  
NOVO CIMENTO BIOCERÂMICO EM  
CIRURGIA ENDODÔNTICA: UM  
ESTUDO *IN VITRO***

**Sara Sofia Cruz Domingos**

Dissertação

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

2015

Universidade de Lisboa

Faculdade de Medicina Dentária



**COMPORTAMENTO QUANTO À  
INFILTRAÇÃO BACTERIANA DE UM  
NOVO CIMENTO BIOCERÂMICO EM  
CIRURGIA ENDODÔNTICA: UM  
ESTUDO *IN VITRO***

**Sara Sofia Cruz Domingos**

Dissertação orientada Professor Doutor António Ginjeira

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

2015



*“Decidi não esperar as oportunidades e sim, buscá-las.  
Decidi ver cada dia como uma nova oportunidade de ser feliz.”*

*Walt Disney*

# ÍNDICE GERAL

<b>Abreviaturas.....</b>	<b>viii</b>
<b>Agradecimentos .....</b>	<b>ix</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>x</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>xi</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>1</b>
1. Endodontia.....	1
2. Bactérias.....	1
3. Insucesso endodôntico.....	3
4. Cirurgia endodôntica .....	4
5. Apexificação.....	4
6. Preparação apical.....	5
7. Obturação retrógrada.....	5
8. Materiais de obturação retrógrada .....	6
<b>Objetivos.....</b>	<b>9</b>
<b>Materiais e Métodos .....</b>	<b>10</b>
1. Variáveis a testar .....	10
1.1. Material de obturação retrógrada.....	10
1.2. Estirpe bacteriana.....	10
2. Preparação das amostras.....	11
3. Preparação do modelo experimental.....	12
4. Execução das experiências.....	12
5. Preparação da estirpe referência.....	13
6. Curva de calibração .....	13
7. Inoculação .....	14
8. Análise .....	15
<b>Resultados.....</b>	<b>16</b>
1. Eficácia de selagem .....	16
<b>Discussão.....</b>	<b>19</b>
1. Material a ser testado .....	19
2. Estirpe bacteriana .....	19
3. Modelo de dupla câmara .....	19

<b>4. Interpretação de resultados.....</b>	<b>20</b>
<b>5. Críticas ao estudo .....</b>	<b>20</b>
<b>Conclusão .....</b>	<b>22</b>
<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>23</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>26</b>
<b>Anexo 1: Curva de calibração .....</b>	<b>26</b>
<b>Anexo 2: Controlo do grupo 1.....</b>	<b>27</b>
<b>Anexo 3: Controlo do grupo 2.....</b>	<b>28</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. BCRR .....	10
Figura 2. Destartarização .....	11
Figura 3. Secção ao nível da junção cimento-esmalte .....	11
Figura 4. Protaper Universal.....	11
Figura 5. Instrumentação mecanizada .....	11
Figura 6. Retropreparação ultrassónica .....	12
Figura 7: Apicectomy .....	12
Figura 8. Retrobturação .....	12
Figura 9. Selante .....	12
Figura 10. Microtubos com Cpg.....	14
Figura 11. Colocação das raízes nos microtubos.....	14
Figura 12. Esquema de dupla câmara.....	14
Figura 13. Incubação da estirpe <i>E. faecalis</i> .....	15
Figura 14. Dentes negativos (roxo) e positivos (amarelo).....	15

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Fatores de virulência da <i>E. faecalis</i> .....	3
Tabela 2. Passos para a eliminação da <i>E. faecalis</i> .....	3
Tabela 3. Vantagens e desvantagens dos materiais de retrobturação .....	6
Tabela 4. Constituição do MTA e do BCRR .....	8

## **ÍNDICE DE GRÁFICOS**

Gráfico 1. Percentagem de dentes positivos por dia no grupo 1 .....	16
Gráfico 2. Percentagem total de dentes positivos e negativos.....	17
Gráfico 3. Percentagem de dentes positivos por dia no grupo 2 .....	18
Gráfico 4. Percentagem de dentes positivos e negativos no grupo 2 .....	18

## Abreviaturas

---

BCRR – *EndoSequence BioCeramic Root-end Repair*

COS – sangue de carneiro

CPg – peptonado suplementado com 5 % glucose

d.o. – densidade ótica

*Enterococcus faecalis* – *E. faecalis*

MTA – *mineral trioxide aggregate* (agregado trióxido mineral)

OZE – óxido de zinco eugenol

SB – meio de *Slanetz & Bartley*

TSA – *Tryptona Soya Agar*

ufc/ml – colónias/mililitro

## **Agradecimentos**

---

Gostaria de agradecer ao Professor Doutor António Ginjeira, pela disponibilidade, pelo apoio prestado, pela paciência, pela boa disposição e pela a motivação. E, em segundo lugar, à Mestre Carla Carneiro, pela imensa paciência e todo o apoio na parte laboratorial do estudo.

Aos meus pais, que sempre acreditaram em mim e me acompanharam neste percurso académico. Um agradecimento especial aos meus avós, à minha prima Rita Guerra e aos restantes familiares por todo o apoio e carinho.

Ao meu namorado, Hassan Cherif Kanouni, pelo apoio, motivação, foco e incentivo a seguir os meus sonhos e torná-los realidade.

Às Vanessas, Antunes e Neves, pois sem elas não teria sido o mesmo. O nosso trio criou sem dúvida muito boas memórias nesta faculdade e tenho a certeza que ainda vamos criar muito mais no futuro. Obrigada por estarem sempre presentes, tanto nos melhores como nos piores momentos.

Ao Ivo Cavaleiro e Neuza Marcelino, pela amizade e pelas horas intensas de estudo. Obrigada por todas as tentativas sucedidas e falhadas de não me deixarem dormir em vésperas de exames. Foram um grande apoio em todo este percurso.

À minha dupla, Pedro Pimenta, pela paciência, apoio e companheirismo prestado nos anos clínicos. Às amigas e colegas, Ana Rita Nunes, Bárbara Menezes, Filipa Almeida, Marta Barreiros, Sara Mendes, Catarina Leonardo, Beatriz Pereira, Maria João Valadas. E aos restantes amigos e colegas de trabalho Gilberto Maia, Maria Areosa, Esmeralda Martins e Miguel Arraiolos.

E por último, mas não menos importante, um agradecimento especial ao Jorge, às assistentes da clínica 1, aos docentes e aos pacientes, pois sem eles nada disto seria possível.



## Resumo

---

**Objetivos:** O objetivo deste estudo é tentar capacitar qual a eficácia de selagem de um novo cimento biocerâmico, o EndoSequence BioCeramic Root-end Repair (BCRR), quanto à infiltração da *E. faecalis*.

**Materiais e métodos:** Foram realizados dois grupos, o primeiro com 27 dentes e o segundo com 10 dentes. Os dentes foram destartarizados e cortados com um disco de tungsténio em peça de mão reta abaixo da junção amelo-cementária. Posteriormente foram instrumentados com Protaper Universal e foi realizada apicectomia a 3mm do ápex radicular. Seguidamente, os dentes foram isolados com verniz de unhas. Foi realizada a retrobturação com o material em estudo, seguindo as indicações do fabricante, e foi colocado um vedante através do molde com microtubos. Os dentes foram esterilizados em autoclave. Foram de seguida colocados em microtubos, através do modelo de câmara dupla, sendo colocado uma solução estéril na câmara 2 e o inóculo no interior canalar na câmara 1, estando o vedante a separar ambas. Por último, as amostras foram incubadas em estufa durante 20 dias e foram registados os resultados através da alteração da cor do meio na câmara 2.

**Resultados:** Este estudo sugere elevadas percentagens de infiltração do BCRR, sendo estas de 81% no grupo 1 e de 40% no grupo 2.

**Conclusões:** Não são possíveis tirar conclusões definitivas devido às percentagens de infiltração serem díspares em ambos os grupos e devido falta de estudos sobre utilizando este material.

**Palavras-chave:** EndoSequence BioCeramic Root-end Repair, *E. faecalis*, infiltração bacteriana, retrobturação.

## Abstract

---

**Purpose:** The aim of this study is trying to comprehend the effectiveness of the sealing of a new bioceramic, the Endosequence Bioceramic Root-end Repair (BCRR), regarding the leakage of *E. faecalis*.

**Materials and methods:** Two groups were conducted, the first with 27 teeth and the second with 10 teeth. The teeth were cleaned with an ultrasound and cut with a tungsten disk of a handpiece below the cemento-enamel junction. Subsequently they were instrumented with Protaper Universal and an apicoectomy was made 3mm from the root apex. Then the teeth were isolated with nail polish. Retrofilling was done with the material being studied, following the manufacturer's instructions, and a sealant was placed through the mold with microtubes. The teeth were sterilized in an autoclave. Thereafter they were placed into microtubes, in a dual-chamber model, and placed in a sterile solution in chamber 2 and the inoculum canalar inside the chamber 1, with the sealant separating the two chambers. Finally the samples were incubated in the warm house for 20 days and the results were recorded by the change of the color of the solution in chamber 2.

**Results:** This study suggests a high leakage percentages of BCRR, which are 81% in group 1 and 40% in group 2.

**Conclusions:** It is not possible to reach firm conclusions due to leakage percentages because they are distinct in both groups and due to lack of studies using this material.

**Keywords:** Endosequence Bioceramic Root-end Repair, *E. faecalis*, bacterial leakage, retrofilling.

## Introdução

---

### 1. Endodontia

A endodontia pode ser definida, através da Associação Americana de Endodontia, como “a disciplina da Medicina Oral que se dedica ao estudo da prevenção, etiopatogenia, histologia, diagnóstico e tratamento das doenças da polpa e das suas repercussões patológicas sobre outros, nomeadamente o periodonto, e da fisiopatologia do órgão pulpo-dentinário” (Ginjeira, 2008).

A preservação dos dentes naturais é um dos objetivos fundamentais na medicina dentária moderna (Harikaran *et al.*, 2010; Willershausen *et al.*, 2011). A invasão de microrganismos ou a infiltração dos seus subprodutos nos tecidos periapicais acredita-se que seja a causa principal para a presença de patologia periapical (Nawal *et al.*, 2000; Harikaran *et al.*, 2010). O principal objetivo dos tratamentos endodônticos passa pela remoção desses irritantes através de métodos químicos e mecânicos e pela a obturação dos canais radiculares nas três dimensões (Nawal *et al.*, 2000; Harikaran *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2014). O tratamento endodôntico não cirúrgico tem uma elevada taxa de sucesso, sendo a adequada preparação e obturação canalar a chave para o mesmo (Cohen & Burns, 2000; Nair *et al.*, 2011).

### 2. Bactérias

Está estabelecido que as bactérias iniciam as infeções pulpare periapicais, estando o sucesso do tratamento endodôntico diretamente relacionado com a diminuição dos microrganismos nos canais radiculares. Acredita-se que a maior causa do insucesso endodôntico esteja relacionado com a sobrevivência de organismos na porção apical dos canais radiculares (Sundqvist *et al.*, 1998; Pinheiro *et al.*, 2003).

Podem ser encontradas bactérias persistentes nos canais radiculares em polpas necróticas que sobrevivem aos procedimentos biomecânicos, podendo estar localizadas em canais não encontrados ou subinstrumentados. Outra origem provável da presença de bactérias pode ser a cavidade oral, contaminando o sistema canalar durante tratamentos com controlo asséptico inadequado ou através de infiltração coronal (Pinheiro *et al.*, 2003).

Estudos sobre a flora bacteriana presente nos canais previamente tratados endodonticamente com lesões periapicais revelam que essa flora difere marcadamente daquela encontrada em polpas de canais radiculares necróticos (Sundqvist *et al.*, 1998). Ao contrário das infecções endodônticas primárias, que têm uma natureza polimicrobiana sendo dominada por bacilos anaeróbios gram-negativos, as infecções endodônticas secundárias são compostas por uma ou poucas espécies bacterianas, onde predominam os microrganismos gram-positivos (Pinheiro *et al.*, 2003; Stuart, *et al.*, 2006).

Das espécies que são passíveis de sobreviver ao tratamento endodôntico, *Enterococcus faecalis* é uma das mais encontradas nos insucessos dos tratamentos (Sundqvist *et al.*, 1998; Pinheiro *et al.*, 2003; Stuart *et al.*, 2006; Gajan *et al.*, 2009; Nair *et al.*, Rôças & Siqueira, 2012; Wang *et al.*, 2012; Ardizzoni *et al.*, 2013). Esta espécie sobrevive por um longo período de tempo até que as condições no interior dos canais radiculares sejam alteradas, permitindo o seu crescimento (Ardizzoni *et al.*, 2013). A *E. faecalis* é um organismo persistente que, apesar de representar uma pequena porção da flora em canais não tratados, tem um papel importante na etiologia de lesões periapicais após tratamentos endodôntico e em infecções persistentes (Stuart *et al.*, 2006).

Atualmente, são reconhecidas 23 espécies diferentes de *enterococci* divididos em 5 grupos. A *E. faecalis* encontra-se sob a forma de cocos gram-positivos anaeróbios facultativos, tendo a habilidade de crescer na presença ou ausência de oxigênio. Esta está presente na cavidade oral, tendo uma maior prevalência nos pacientes em tratamento ou retratamento endodôntico. A sua prevalência em infecções primárias é de 4-40%, enquanto que em insucessos endodônticos e infecções periapicais persistentes é de 24-77% (Stuart *et al.*, 2006). Esta mostrou habilidade de sobreviver em canais radiculares como organismo único sem suporte de outras bactérias (Sundqvist *et al.*, 1998).

Embora a *E. faecalis* possua diversos fatores de virulência, a sua habilidade de causar lesão periapical provém da sua capacidade de sobreviver aos efeitos do tratamento canalar, persistindo como um patógeno no sistema canalar e túbulos dentinários. A combinação de uma adequada instrumentação, uso apropriado dos irrigantes, medicamentos e selagem vai otimizar as oportunidades de erradicação desta bactéria durante o retratamento de canais endodôntico. Na tabela 1 estão apresentados os fatores de virulência da *E. faecalis* e na tabela 3 quais os passos para a eliminação da mesma (Stuart *et al.*, 2006).

### **Sobrevivência e fatores de virulência da *E. faecalis***

Suporta prolongados períodos de privação nutricional

Liga-se à dentina e invade eficazmente os túbulos dentinários

Altera a resposta do hospedeiro

Suprime a ação dos linfócitos

Possui enzimas líticas, citolisina, substância agregadora, feromonas e ácido lipoteicóico

Utiliza o soro como fonte nutricional

Resiste à medicação intracanal:

- Mantém a homeostasia do pH
- Propriedades da dentina diminuem o efeito do hidróxido de cálcio

Compete com outras células

Forma um biofilme

**Tabela 1. Fatores de virulência da *E. faecalis***

### **Passos da eliminação da *E. faecalis***

Técnica asséptica, bochecho pré-tratamento com clorexidina, desinfecção do dente e do dique de borracha, desinfecção da gutta-percha com hipoclorito de sódio

Adequada instrumentação (aumento do tamanho do preparo apical)

Irrigação canal:

- Hipoclorito de sódio 6%
- EDTA 17%
- Clorexidina 2%

Medicamentos intracanales:

- Gel de clorexidina 2%
- Gel de clorexidina 2% + hidróxido de cálcio

Obturação com cimento AH plus

Restauração coronal bem selada

**Tabela 2. Passos para a eliminação da *E. faecalis***

## **3. Insucesso endodôntico**

Caso a flora bacteriana não seja eficazmente eliminada, estamos perante um caso de insucesso endodôntico (Walton & Torabinejad, 2002; Ginjeira, 2008). Se tal

acontecer não vai ocorrer reparação ou regeneração do tecido ósseo, cimento e ligamento periodontal, que são caraterísticos da resolução da periodontite apical (Ginjeira, 2008). O insucesso impõe o retratamento, podendo ser necessária uma intervenção cirúrgica para remover tecidos afetados, excisão do ápex e encerramento da porção apical dos canais radiculares. Ambas as abordagens diferem significativamente, porque o retratamento tem como objetivo a eliminação das bactérias presentes no sistema canalar, enquanto a cirurgia endodôntica tem o objetivo de as confinar dentro do mesmo, impedindo a sua passagem para o periodonto apical (Walton & Torabinejad, 2002; Ginjeira 2008).

O insucesso pode ser devido a infiltração apical, sendo este o fator major, ou através de infiltração coronal. A infiltração coronária pode ocorrer devido a falha ou perda de material restaurador, permitindo que o material de obturação esteja em contato com os fluidos orais (Walton & Torabinejad, 2002; Oliveira *et al.*, 2011).

#### **4. Cirurgia endodôntica**

A terapia endodôntica cirúrgica é a abordagem de escolha quando o retratamento ortógrado falha ou é contra-indicado (Cohen & Burns, 2000; Walton & Torabinejad, 2002; Ginjeira, 2008; Harikaran *et al.*, 2010; Nair *et al.*, 2011).

O objetivo da cirurgia em endodontia é remover a doença, evitar a sua recorrência e facilitar o reparo através da obtenção de selagem apical para prevenir a entrada de irritantes residuais nos tecidos periapicais (Cohen & Burns, 2000; Nair *et al.*, 2011). O diagnóstico na cirurgia endodôntica requer a determinação precisa das razões que levaram ao insucesso endodôntico, e à convicção de que este pode ser corrigido pelo procedimento cirúrgico adequado (Cohen & Burns, 2000).

#### **5. Apexificação**

A apexificação é uma parte integrante da cirurgia endodôntica que elimina as porções apicais dos dentes com lesões. Estas porções podem mostrar maior ou menor grau de reabsorção, raízes adicionais não encontradas radiograficamente, extravasamento dos materiais de obturação ou corpos estranhos, fraturas radiculares apicais e ramificações apicais como canais laterais ou acessórios que podem escapar à limpeza e desinfeção e atuar como fatores para insucesso do tratamento (Cohen &

Burns, 2000; Harikaran *et al.*, 2010). A apexificação tem dois objetivos: remoção da porção apical radicular não tratada, permitindo ao endodontista determinar a causa do insucesso; e providenciar uma superfície lisa para preparação da cavidade apical e obturação da mesma (Walton & Torabinejad, 2002).

## **6. Preparação apical**

A técnica de retropreparo ultrassónico foi planeada para suprir as principais deficiências dos preparos convencionais que utilizam brocas (Cohen & Burns, 2000; Walton & Torabinejad, 2002; Ginjeira, 2008). A utilização dos aparelhos ultrassónicos no retropreparo ajudou a padronizar os preparos e aumentou as possibilidades de que estes estejam bem realizados (Cohen & Burns, 2000).

O objetivo da preparação apical é a remoção da porção final dos canais radiculares e, simultaneamente, criar uma cavidade classe I (Kim & Kratchman, 2006; Ginjeira, 2008). Devido ao tamanho muito reduzido da ponta ultrassónica, ela é facilmente colocada na janela óssea de modo a acompanhar o mesmo sentido do eixo longitudinal da raiz, mesmo em áreas de difícil acesso. A preparação ultrassónica facilita a obtenção de um preparo ideal, a uma profundidade de 3 mm e acompanhando a verdadeira inclinação axial. Esses preparos devem cumprir as seguintes exigências: os 3 mm apicais da raiz devem estar limpos e preparados; preparo paralelo ou coincidente ao contorno anatómico do espaço pulpar; presença de uma forma de retenção adequada; tecido do istmo removido; e paredes dentinárias remanescentes não enfraquecidas. Os preparos ultrassónicos feitos adequadamente correspondem à verdadeira configuração anatómica do sistema de canais radiculares (Cohen & Burns, 2000).

## **7. Obturação retrógrada**

A apexificação e a preparação retrógrada do canal radicular são seguidas pela colocação de material de material para selar o mesmo (Cohen & Burns, 2000; Ginjeira, 2008; Nair *et al.*, 2011). A função primária da obturação retrógrada é selar hermeticamente o ápex seccionado e aprisionar quaisquer irritantes remanescentes no interior do sistema canalar, prevenindo infiltração de irritantes do canal radicular para os tecidos periapicais que poderiam levar ao insucesso do tratamento (Harikaran *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011, Cohen & Burns, 2000).

## 8. Materiais de obturação retrógrada

Os materiais ideais para obturação retrógrada devem ser biocompatíveis, com capacidade de adesão à dentina, insolúveis, dimensionalmente estáveis, visíveis radiograficamente e, talvez o mais importante, terem a capacidade de selar o sistema canal ar através de uma obturação hermética (Walton & Torabinejad, 2002; Tonomaru-Filho *et al.*, 2007; Nair *et al.*, 2011; Willershausen *et al.*, 2011; Baechtold *et al.*, 2015). Além disso, os materiais devem ter propriedades antibacterianas para prevenir reinfecções endodônticas e habilidade para reparação óssea (Walton & Torabinejad, 2002; Tonomaru-Filho *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2014; Baechtold *et al.*, 2015).

Uma variedade de materiais restauradores têm sido adaptados para utilização no selagem do ápex, sendo os mais comuns o amálgama, cimentos óxido de zinco eugenol (OZE) e agregado trióxido mineral (MTA) (Nair *et al.*, 2011). As características dos materiais estão descritos na Tabela 3 (Cohen & Burns, 2000; Nair *et al.*, 2011; Han & Okiji, 2013).

	Amálgama	Cimentos OZE	MTA
Manuseamento	✓	✓	×
Adaptação	✓	✓	✓
Biocompatível	✓	✓	✓
Não reabsorvível	✓	✓	✓
Bacteriostático	✓	✓	✓
Radiopacidade	✓	✓	✓
Selagem apical	×	✓	✓
Toxicidade	✓	✓	✓
Potencial de reparação	×	✓	✓
Necessidade de retenção	×	×	✓
Pigmentação dos tecidos	×	✓	×
Tempo de presa	✓	✓	×
Estabilidade dimensional	×	✓	✓
Sensibilidade à humidade	×	✓	✓

Tabela 3. Vantagens e desvantagens dos materiais de retrobturação



O MTA é amplamente utilizado em várias aplicações na área da endodontia para tratamento de perfurações, proteções pulpares, pulpotomia, obturação retrógrada e barreira apical para dentes com o ápex aberto (AlAnezi *et al.*, 2009; Nair *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2011; Shokouhinejad *et al.*, 2012; Han & Okiji, 2013). Este demonstra uma habilidade de selagem e biocompatibilidade superior quando comparado com outros materiais. No entanto, a sua manipulação difícil e lento tempo de presa tornam o MTA difícil de utilizar (AlAnezi *et al.*, 2009; Nair *et al.*, 2011; Azimi *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2014).

Os materiais biocerâmicos são “produtos ou componentes cerâmicos utilizados em aplicações médicas e dentárias, principalmente como implantes e materiais de substituição óssea, os quais têm propriedades osteoindutoras” (AlAnezi *et al.*, 2009). Estes foram introduzidos em medicina dentária, mais especificamente na endodontia, sob a forma de materiais de reparações apicais de perfurações radiculares (Azimi *et al.*, 2013). Os materiais biocerâmicos surgiram em substituição ao MTA (Shokouhinejad *et al.*, 2012). O fabricante de um novo material, *EndoSequence BioCeramic Root-end Repair* (BCRR), alega propriedades físicas e mecânicas semelhantes ao MTA, apresentando vantagens no manuseamento e tempo de presa (Nair *et al.*, 2011). Este é fornecido como um material de pré-mistura, sob forma de *putty* ou injetável, promovendo uma consistência homogênea que utiliza a humidade do canal radicular para a reação de presa (Shokouhinejad *et al.*, 2012; Han & Okiji, 2013). Devido à sua habilidade de penetrar nos túbulos dentinários e de interagir com a humidade, pode ser esperada uma estabilidade dimensional ótima e com o menor grau de contração possível (Azimi *et al.*, 2013). Estudos demonstraram que é tão eficaz quanto o MTA em termos de atividade antimicrobiana, biocompatibilidade e capacidade de selagem. Os biocerâmicos conseguem induzir a diferenciação dos fibroblastos do ligamento periodontal, sendo a sua bioatividade comparável com o MTA (AlAnezi *et al.*, 2009; Shokouhinejad *et al.*, 2012; Azimi *et al.*, 2013). O facto destes apresentarem um pH alcalino pode ser responsável pela sua atividade antimicrobiana (AlAnezi *et al.*, 2009; Azimi *et al.*, 2013). A constituição do MTA e do BCRR está descrita na Tabela 4 (AlAnezi *et al.*, 2009; Han & Okiji, 2013).

Material	Composição segundo o fabricante	
MTA	Pó + líquido	Silicato tricálcio, silicato dicálcio, aluminato tricalcio, óxido bismuto, sulfato de cálcio + água
BCRR		Silicato tricálcio, silicato dicálcio, fosfato de cálcio monobásico, hidróxido de cálcio, sílica coloidal, agente de espessamento isento de água

**Tabela 4. Constituição do MTA e do BCRR**

## Objetivos

---

### Objetivo primário:

Avaliar a infiltração de *Enterococcus faecalis* através do material de obturação BCRR.

### Hipóteses do objetivo primário:

H0: O material de obturação BCRR não impede a infiltração de *Enterococcus faecalis*.

H1: O material de obturação BCRR impede a infiltração de *Enterococcus faecalis*.

## Materiais e Métodos

---

### 1. Variáveis a testar

A função primária da obturação retrógrada é selagem da porção apical da raiz seccionada de modo a aprisionar quaisquer irritantes remanescentes no interior do sistema canalar, prevenindo infiltração dos mesmos para os tecidos periapicais. Assim sendo, é importante perceber a eficácia dos materiais de retrobturação em relação à selagem do espaço canalar e à infiltração bacteriana. Esta etapa do tratamento é um dos fatores que influencia decisivamente o resultado do tratamento endodôntico, visto que a passagem de bactérias do sistema canalar para os tecidos da região periapical vai ditar o sucesso ou insucesso endodôntico.

#### 1.1. Material de obturação retrógrada

Neste estudo tentou perceber-se qual a capacidade de selagem de um material recentemente proposto para obturação de cavidades retrógradas em cirurgia endodôntica, o BCRR, e comparar com um material que têm sido utilizado tradicionalmente para o mesmo objetivo, o MTA. Na figura 1 está ilustrado uma embalagem de BCRR.

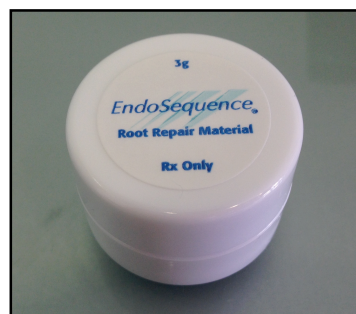


Figura 1. BCRR

#### 1.2. Estirpe bacteriana

No presente estudo experimental foi usada uma bactéria anaeróbia facultativa, mais especificamente, uma estirpe de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). O motivo que levou a escolher a *E. faecalis* para este estudo foi o facto de ser a bactéria patogénica mais frequentemente isolada em casos de insucesso dos tratamentos endodônticos. Esta tem sido frequentemente associada à patologia periapical, levando à necessidade de retratamento, quer ortógrado quer retrógrado.

## **2. Preparação das amostras**

Para a realização deste estudo foram recolhidos 30 incisivos, por serem uniradiculares, apresentando na sua maioria um canal único e reto. A amostra de dentes foi dividida em dois grupos: teste (n=27) e controlo (n=3). Tanto os dentes do grupo teste como os do grupo controlo foram preparados de igual forma. A primeira etapa deste estudo passou pela destartarização da superfície radicular dos mesmos com pontas ultrassónicas, como mostra a figura 2. Seguidamente, foram seccionados ao nível da junção cimento-esmalte usando um disco de tungsténio montado num mandril longo para peça-de-mão reta, mantendo o comprimento da raiz em 15 mm, demonstrado na figura 3.



**Figura 2. Destartarização**



**Figura 3. Secção ao nível da junção  
cimento-esmalte**

Todas as raízes foram preparadas endodonticamente utilizando instrumentação mecanizada, conforme ilustrado na figura 4. O sistema utilizado foi o Protaper Universal (figura 5), seguindo a sequência recomendada pelo fabricante, até um instrumento F2, a que corresponde um diâmetro apical de cerca de 0,25mm. Durante a instrumentação, foi estabelecida permeabilidade através de uma lima 10K e os canais foram irrigados com água destilada.

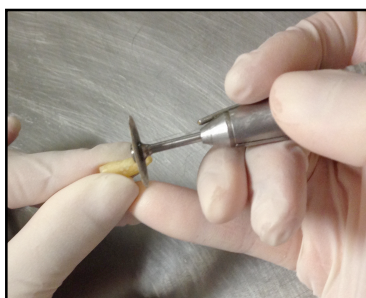


**Figura 4. Protaper Universal**

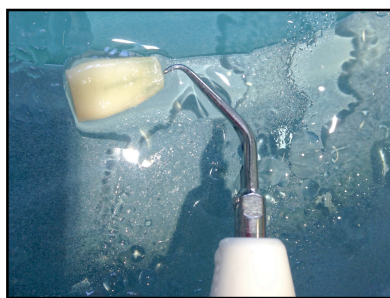


**Figura 5. Instrumentação mecanizada**

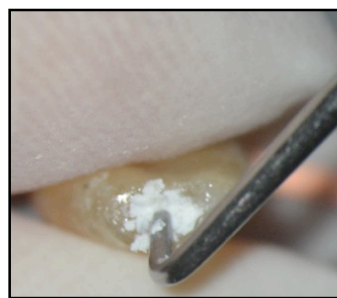
Foi realizada uma apicectomia a 3mm do ápex anatômico, perpendicular ao maior eixo do dente, tendo sido utilizado um disco de tungstênio montado num mandril longo para peça-de-mão reta, ilustrado na figura 6. Posteriormente, as raízes foram cobertas com duas camadas de verniz de unhas. A figura 7 revela o passo seguinte que envolveu a preparação de uma cavidade com 3mm de profundidade usando uma ponta ultrassônica para o devido efeito, com a regulação de potência na posição 6.



**Figura 6. Apicectomia**



**Figura 7. Retropreparação ultrassônica**

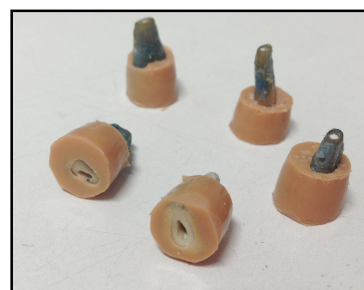


**Figura 8. Retrobturação**

Utilizando o material de acordo com as recomendações do respetivo fabricante, as cavidades apicais preparadas foram obturadas. Este passo foi realizado sob ampliação de 10x, com o auxílio do microscópio cirúrgico. Este material foi inserido através de incrementos, tendo sido condensado com um microcalcador (figura 8).

### **3. Preparação do modelo experimental**

Depois de preparar as raízes da forma acima descrita, foi fabricado um selante envolvendo cada raiz e perpendicularmente à mesma. Este vedante foi fabricado em silicone de adição, usando microtubos (*Eppendorf*) de 1,5 ml como molde, demonstrado na figura 9. (Ginjeira, 2008)



**Figura 9. Selante**

### **4. Execução das experiências**

Após a preparação das raízes e da elaboração do vedante, as raízes foram empacotadas em grupos de 5 em mangas de esterilização. De seguida foram esterilizadas em autoclave a 134°C durante 50 minutos.

## 5. Preparação da estirpe referência

A estirpe referência de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) foi inoculada em agar columbia suplementado com 5% sangue de carneiro (COS) (bioMérieux), tendo sido posteriormente incubada a 37°C durante 24 h (1ª passagem). Após a incubação foi confirmada pureza da cultura através de uma coloração de Gram. Posteriormente, foi isolada uma colónia para nova placa de COS e incubada a 37°C durante 18 h (2ª passagem).

Para os protocolos de infecção, só se utilizaram culturas de *E. faecalis* com duas passagens prévias em meio de cultura sólido (COS).

## 6. Curva de calibração

Foi preparada uma suspensão de turbidez desconhecida, da estirpe em estudo, em soro fisiológico 0,9%. De seguida transferiu-se 1 ml de soro fisiológico estéril para uma cuvete de espectrofotometria e 1 ml das primeiras quatro diluições para quatro cuvetes individuais. Procedeu-se à leitura da densidade óptica (d.o.) em espectrofotómetro a 600 nm (tNanoDrop 2000c, Thermo Scientific) tendo sido registados os valores de absorvância. Posteriormente, realizou-se a elaboração de diluições decimais de base 10, até esgotamento do inóculo, de acordo com as leituras de densidade óptica previamente efectuadas. Inoculou-se em meio de *Tryptona Soya Agar* (TSA) (Liofilchem), à superfície e em duplicado, 100 µL das diluições e foi incubado a 37°C durante 24 h. Por último, procedeu-se à contagem de todas as placas que contenham entre 15 e 150 unidades formadoras de colónias/mililitro (ufc/ml). Este protocolo foi repetido três vezes durante três dias consecutivos (consultar anexo 1).

O cálculo do número de unidades formadoras e presentes em cada um das suspensões iniciais (dia 1, 2 e 3) foi determinado de acordo com a fórmula:

$$\text{ufc/ml} = \text{média de número de colonias} \times \text{inverso da diluição} \times \text{factor diluição}^*$$

\*Factor de diluição só é aplicável quando o volume inoculado é diferente de 1 ml.



## 7. Inoculação

Dentro de uma câmara de fluxo laminar, preparou-se uma suspensão de *E. faecalis* em 5 ml de soro fisiológico a 0,9%, a partir de uma cultura com 24 h. Seguidamente, transferiu-se 1 ml da suspensão para uma cuvete de espectrofotometria e 1 ml de soro fisiológico 0,9% estéril (branco) para outra cuvete de forma a medir a densidade óptica da suspensão inicial (d.o.= 600 nm). Após determinação da d.o., a concentração da suspensão foi ajustada para  $2 \times 10^8$  ufc/ml.

De seguida transferiu-se 500 µL de caldo peptonado suplementado com 5 % glucose (CPg) e 1% de púrpura de bromocresol (indicador de pH) para microtubos de 1,5 ml, tal como se encontra ilustrado na figura 10. Em cada um dos microtubos foi colocada uma das raízes preparadas anteriormente, com a porção apical da raiz (+/- 1 mm) imersa no CPg, demonstrado na figura 11. A figura 12 demonstra esquematicamente como a raiz é mantida em posição pelo vedante de silicone, de forma a criar um ambiente com duas câmaras. (Ginjeira, 2008)

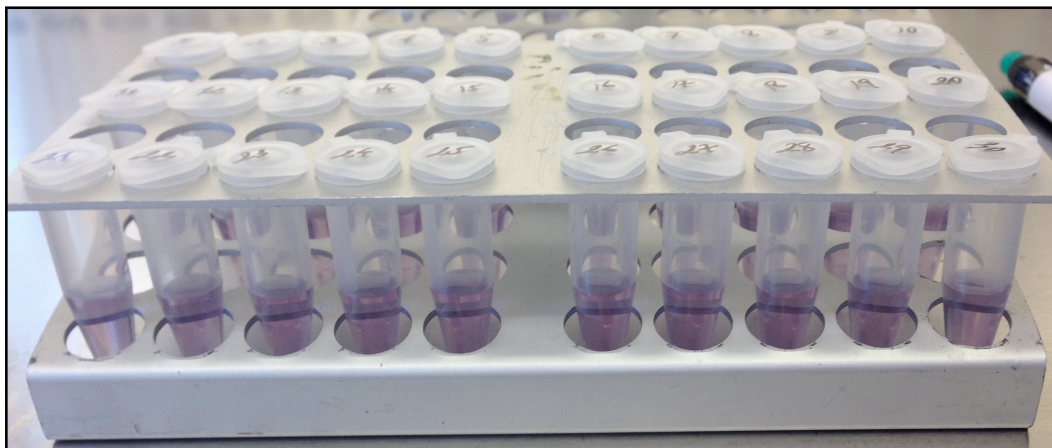


Figura 10. Microtubos com Cpg



Figura 11. Colocação das raízes nos microtubos

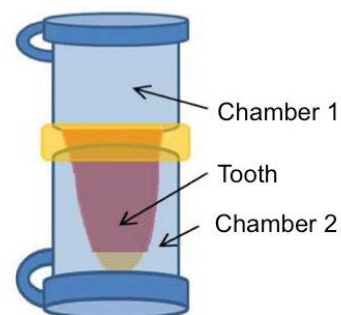
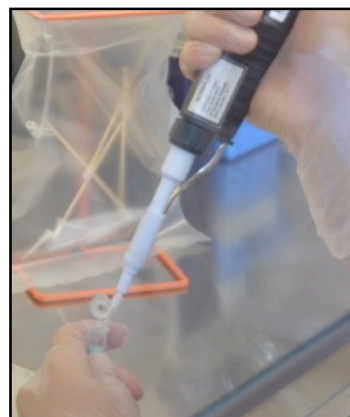


Figura 12. Esquema de dupla câmara



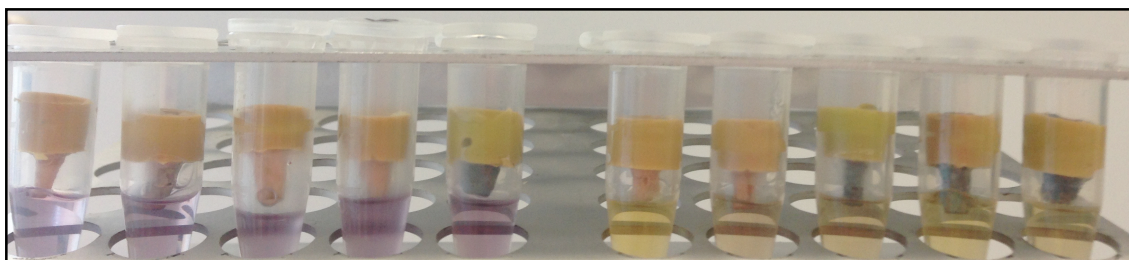
Procedeu-se à inoculação do grupo de dentes teste com 10 µL da suspensão preparada anteriormente contendo  $2 \times 10^8$  ufc/ml no canal radicular e também no grupo controlo (demonstrado na figura 13). No grupo de controlo negativo não foi colocado qualquer inóculo no canal radicular. Os microtubos foram fechados e colocados numa estufa, onde foram incubados a 37°C durante 20 dias.



**Figura 13. Incubação da estirpe  
*E. faecalis***

## 8. Análise

Os tubos foram observados diariamente durante a primeira semana e depois de dois em dois dias até ao final do período de incubação. A observação destinava-se a detetar uma mudança de cor, de roxo para amarelo, do meio CPg, ilustrado na figura 14 (consultar anexo 2 e 3). Esta mudança de cor indicava uma acidificação do meio por fermentação da glicose devido ao metabolismo bacteriano e, portanto, infiltração bacteriana e incapacidade de selagem do material testado.



**Figura 14. Dentes negativos (roxo) e positivos (amarelo)**

Por último, transferiu-se 10 µL de todas as amostras com alteração de cor para meio de *Slanetz & Bartley* (SB) (Liofilchem) e foram incubadas a 37°C durante 48 h. Desta forma foi possível confirmar pureza através da avaliação do crescimento em SB e através de coloração de Gram.

## Resultados

### 1. Eficácia de selagem

A tabela 4 demonstra o grupo teste (n=27) e o grupo controlo (n=3). Foram registados os resultados durante 20 dias, diariamente durante os primeiros 8 dias e depois de dois em dois dias. Os dentes que ficaram positivos significa que ocorreu infiltração bacteriana através do material obturador, enquanto que os dentes negativos significa que a selagem foi eficaz.

No gráfico 1 está descrita a percentagem de dentes positivos por dia após o cada dia de incubação. No gráfico 2 está descrita a percentagem total de dentes positivos (19%) e negativos (81%) no final do período de incubação. Nos controlos negativos verificou-se que não houve crescimento da bactéria, enquanto que no controlo positivo verificou-se o seu crescimento.

#### Grupo 1

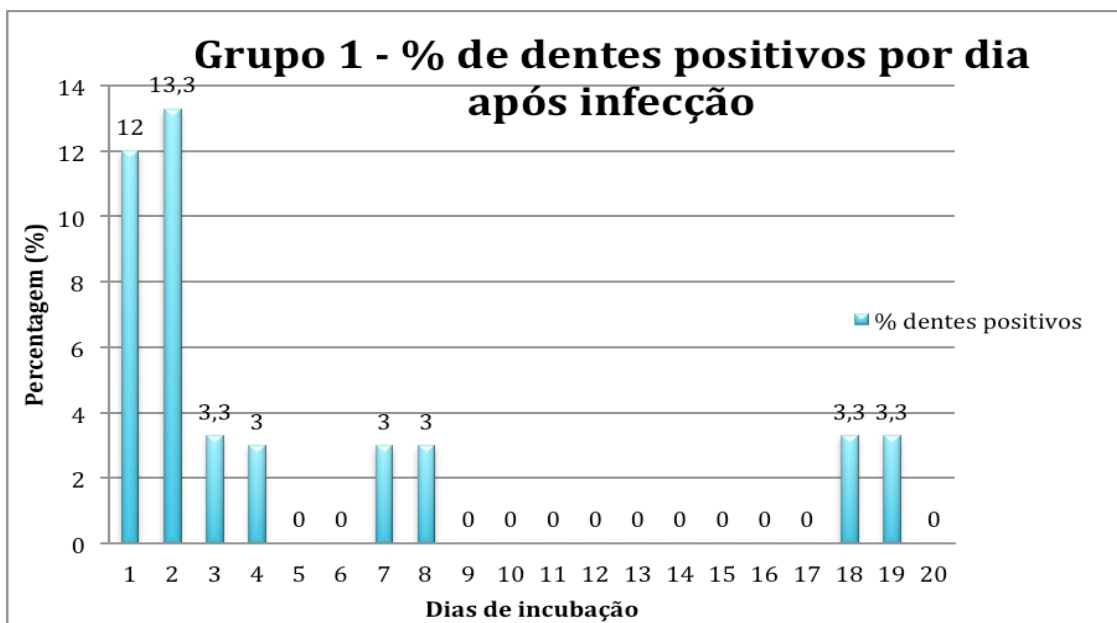
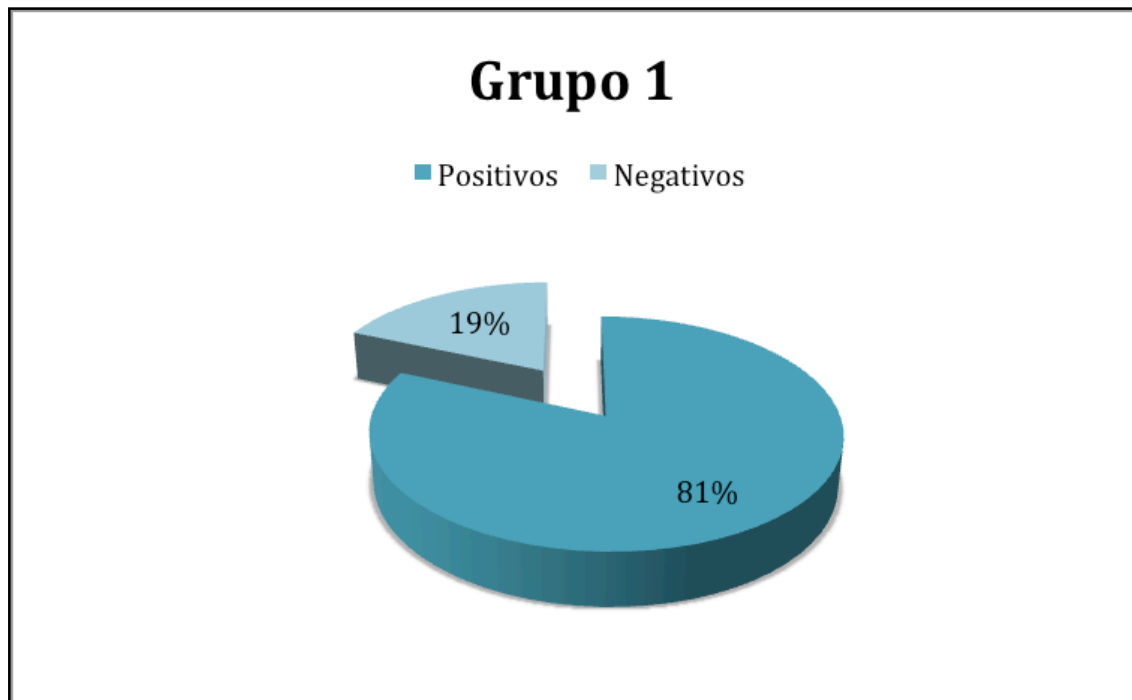


Gráfico 1. Percentagem de dentes positivos por dia no grupo 1



**Gráfico 2. Percentagem total de dentes positivos e negativos**

Após alguns dias de incubação do grupo 1, observou-se que havia uma quantidade de dentes contaminados muito superiores ao esperado. Por esse motivo realizou-se um uma nova amostra, o grupo 2 (n=10). No gráfico 3 está descrita a percentagem de dentes positivos por dia após o cada dia de incubação. No gráfico 4 está descrita a percentagem total de dentes positivos (40%) e negativos (60%).

**Grupo 2**

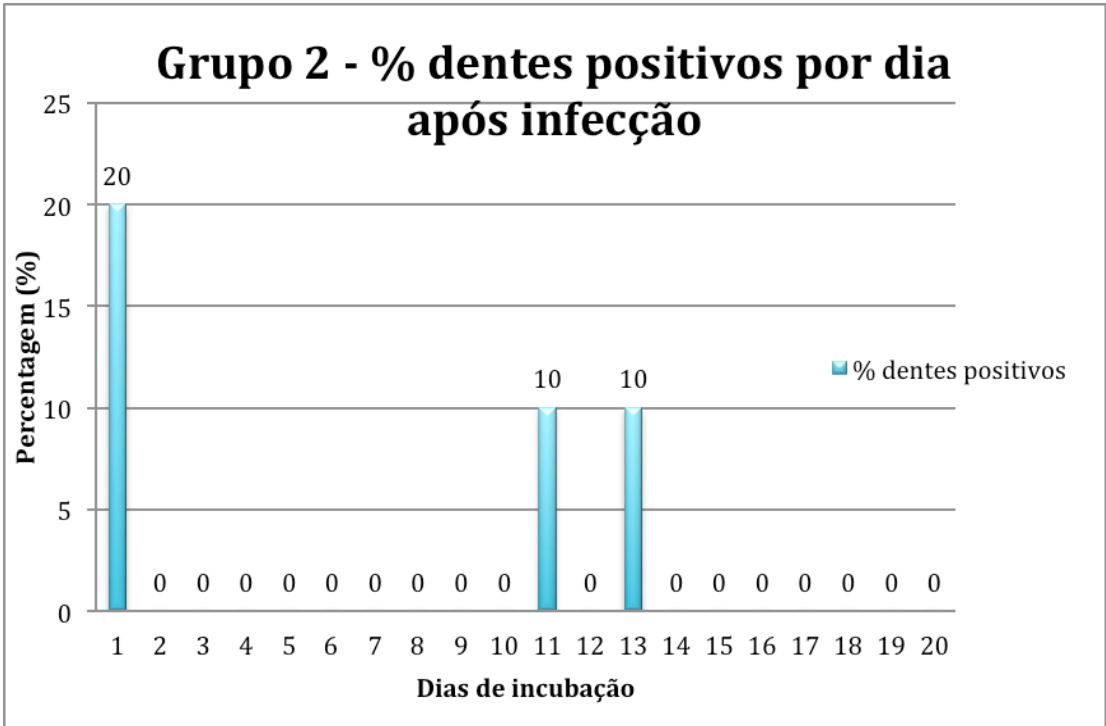


Gráfico 3. Percentagem de dentes positivos por dia no grupo 2

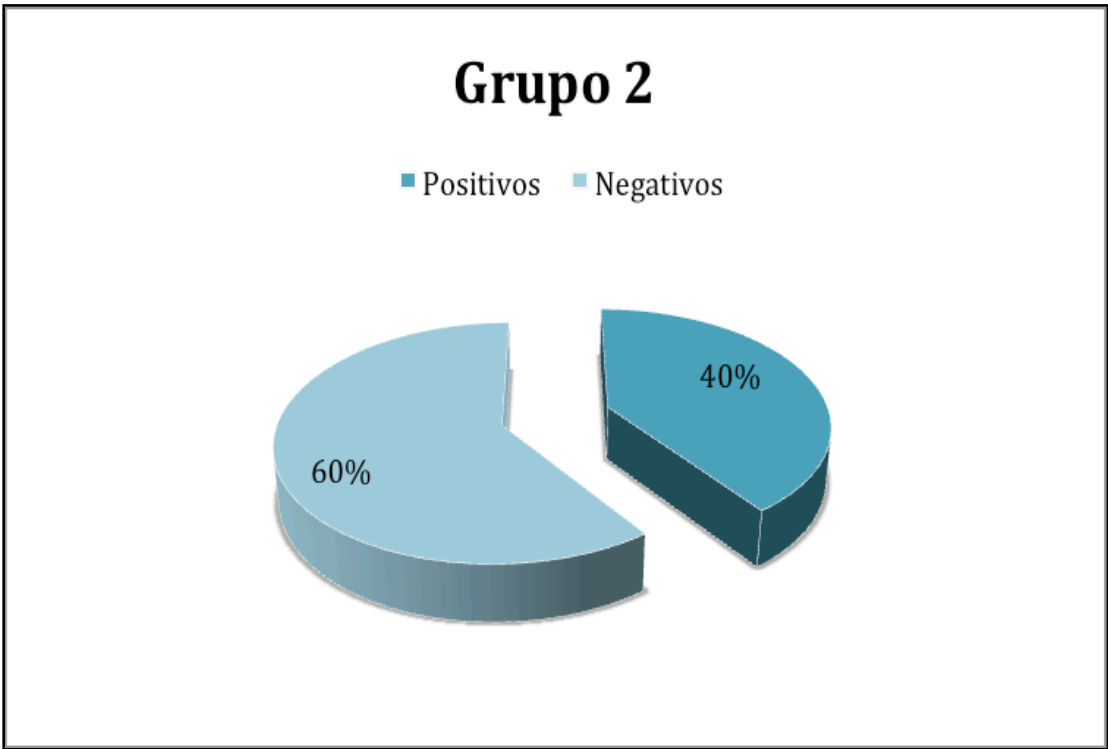


Gráfico 4. Percentagem de dentes positivos e negativos no grupo 2

## Discussão

---

### 1. Material a ser testado

Neste estudo tentou comparar-se a capacidade de selagem de um biocerâmico recente, o BCRR, quanto à sua capacidade de prevenir a infiltração bacteriana, mais especificamente da *E. faecalis*. O material ideal é aquele que, além de outras características importantes já descritas, impede a passagem dos microrganismos do meio canal para os tecidos periapicais.

O objetivo tanto do tratamento ortógrado como cirúrgico é erradicar os microrganismos e selar eficazmente o sistema canal, promovendo condições favoráveis para a cura e reparação dos tecidos periapicais. A qualidade da selagem é considerada um fator crítico, levando ao sucesso ou insucesso do tratamento (Harikan *et al.*, 2000).

### 2. Estirpe bacteriana

A bactéria selecionada para este estudo foi a *E. faecalis* devido à sua enorme prevalência em dentes com persistência de patologia (Sundqvist *et al.*, 1998; Pinheiro *et al.*, 2003; Stuart *et al.*, 2006; Gajan *et al.*, 2009; Nair *et al.*, Rôças & Siqueira, 2012; Wang *et al.*, 2012; Ardizzoni *et al.*, 2013). Esta bactéria é difícil de erradicar, conseguindo sobreviver em condições menos favoráveis (Stuart *et al.*, 2006; Ardizzoni *et al.*, 2013).

### 3. Modelo de dupla câmara

Neste estudo de infiltração bacteriana utilizou-se o modelo de dupla câmara. Na primeira câmara é colocada a raiz do dente, suspensa pelo vedante, estando a porção apical em contato com o meio estéril na segunda câmara. Seguidamente, é introduzido o inóculo no interior do sistema canal e é avaliada a passagem de bactérias através da turvação do meio.

#### 4. Interpretação de resultados

O estudo de Nair e os seus colaboradores compara a capacidade de selagem de dois materiais, o MTA e o BCRR, utilizando a mesma bactéria, a *E. faecalis*. Foi utilizado o mesmo modelo de dupla câmara. Segundo este estudo, tanto na utilização do MTA (53,3%) quando na utilização do BCRR (66,7%) existe uma elevada percentagem de infiltração pela *E. faecalis*, sendo esta maior no último material (Nair *et al.*, 2011).

As diferenças de percentagens de infiltração bacteriana no nosso estudo foram no grupo 1 de 81% e no grupo 2 de 40%. Esta discrepância de valores pode dever-se a 2 fatores: procedimento de esterilização; e o número de dentes da amostra. O grupo 1 foi sujeito a 3 etapas de esterilização, sendo que duas das quais não estavam previstas. Quando foi feita a inoculação no grupo 1, posteriormente ao primeiro processo de esterilização, devido à incorreta adaptação do vedante o meio estéril que se encontrava na câmara 2 submergiu para a câmara 1, havendo uma comunicação entre as duas câmaras através das laterais do vedante e na interface vedante-dente. Por esse motivo, decidiu repetir-se a esterilização dos dentes e colocação de um novo vedante. Para assegurar a adaptação do selante, foi colocada cola adesiva na interface vedante-dente e uma nova camada de verniz das unhas na porção radicular. Os dentes foram sujeitos a nova esterilização, sendo esta a terceira, para que posteriormente fossem colocados nos microtubos. Após inoculação, e devido à grande percentagem de infiltração, optou-se pela realização de um novo grupo, desta vez sendo sujeito a apenas um processo de esterilização. No grupo 1 a nossa amostra foi de 27 dentes, enquanto que no grupo 2 foi de 10 dentes. Esta diferença deveu-se ao facto de não estar previsto a elaboração de 2 grupos distintos.

#### 5. Críticas ao estudo

Inquéritos sobre a literatura têm levantado questões relativamente à validade das observações feitas sobre infiltração bacteriana através de obturações canulares no modelo de câmara dupla (Rechenberg *et al.*, 2011).

A microbiota observada inicialmente na infiltração bacteriana do modelo de dupla câmara contrasta com observações histológicas feitas em dentes que foram obturados e expostos a microbiota oral *in situ* sem selagem coronal durante um longo

período de tempo. O motivo desta discrepância continua desconhecido. Devido à falta de controlos negativos suficientes e apropriados, uma possível explicação é que em meio laboratorial, os microrganismos penetram não através da obturação canalar mas sim através de outras vias, tais como potenciais espaços entre o vedante utilizado para separar as duas câmaras e a parte externa da raiz (Rechenberg *et al.*, 2011).

Houve algum debate sobre a questão das obturações canulares serem tão insuficientes como se acreditou em experiências *in vitro*. Enquanto nos estudos laboratoriais foi encontrada infiltração bacteriana através da obturação num espaço de poucas semanas, observações histológicas em dentes não restaurados e adequadamente obturados que foram extraídos indicaram o contrário. A razão desta discrepância, em condições laboratoriais, está provavelmente mais relacionada com a selagem inadequada entre as duas câmaras no modelo *in vitro*. Permanece questionável por que motivo a infiltração deveria ocorrer através da menor interface entre o material de obturação e o tecido dentário interno, ao invés da interface entre o vedante e a superfície dentária externa. Baseado em erros metodológicos relacionados com estudos de infiltração bacteriana, é aconselhável não usar este tipo de metodologia para comparar diferentes materiais de obturação (Rechenberg *et al.*, 2011).

Quando são considerados estudos sobre a infiltração, tem sido demonstrado que o método selecionado para avaliar a infiltração pode afetar os resultados. Inerente a muitos desses estudos são as deficiências técnicas que podem levar a resultados erróneos. Comparados com as condições clínicas, os estudos *in vitro* com corantes são estáticos e não refletem a interação dinâmica entre o canal radicular e os tecidos periapicais, além de que são qualitativos, o que pode não ser equiparável ao sucesso ou fracasso clínico (Cohen & Burns, 2000).

O facto dos resultados obtidos serem descritos como negativo ou positivo impossibilita a quantificação do crescimento bacteriano (Rechenberg *et al.*, 2011).

## Conclusão

---

Não é possível tirar conclusões relativamente à eficácia de selagem do BCRR, devido às percentagens de infiltração serem díspares nos dois grupos.

Ao estarmos presente um estudo *in vitro* ao invés de um estudo *in vivo* faz com que não seja possível a compreensão da eficácia de selagem do BCRR em condições clínicas.

É fundamental a realização de mais estudos e com amostra mais alargada sobre o BCRR, visto ser um material recente e não haver informação suficiente disponível.



## Referências bibliográficas

---

AlAnezi AZ, Jiang J, Safavi KE, Spangberg LSW, Zhu Q. Cytotoxicity evaluation of endosequence root repair material. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010; 109:122-125.

Ardizzoni A, Generali L, Righi E, Baschieri MC, Cavani F, Manca L, et al. Differential efficacy of endodontic obturation procedures: an ex vivo study. Odontology. 2014; 102:223-231.

Azimi S, Fazlyab M, Sadri D, Saghiri MA, Khosravanifard, Asgary S. Comparison of pulp response to mineral trioxide aggregate and a bioceramic paste in partial pulpotomy of sound human premolars: a randomized controlled trial. International Endodontic Journal. 2013; doi:10.1111/iej.12231.

Baechtold MS, Leonardi DP, Tomazinho FSF, Scaini F, Baratto-Filho F, Haragushiku GA. Bacterial Leakage of Mineral Trioxide Aggregate-based and Resin-based Sealers in Teeth Ready for Root Retainers. J Dent App. 2015; 2(5).

Cohen S, Burns RC. Caminhos da Polpa. Quinta edição. Guanabara Koogan S.A.. 2000

Bhardwaj, SB. Role of *Enterococci faecalis* in failure of Endodontic treatment. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2013; 2(8):272-277.

Ginjeira, A. Infiltração bacteriana em materiais de obturação retrógrada nas apicectomias. 2008. Tese de doutoramento em Endodontia. Universidade de Lisboa.

Han L, Okiji T. Bioactivity evaluation of three calcium silicate-based endodontic materials. International Endodontic Journal. 2013; 46:808-814.

Harikaran, Kavitha, Narayanan. SEM Evaluation of two different root-end preparations and a Comparative Microleakage evaluation of three different Retrofilling materials using two different root-end preparations by Dye Penetration method – an in vitro study. JIDAS. 2010; 1(3).

Nair U, Ghattas S, Saber M, Natera M, Walker C, Pileggi R. A comparative evaluation of the sealing ability of 2 root-end filling materials: an in vitro leakage study using *Enterococcus faecalis*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001; 112(5).

Nawal RR, Parande M, Sehgal R, Rao NR, Naik A. A comparative evaluation of 3 root canal filling systems. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2011; 111:387-393.

Oliveira ACM, Tanomaru JMG, Faria-Junior N, Tanomaru-Filho M. Bacterial leakage in root canals filled with conventional and MTA-based sealers. International Endodontic Journal. 2011; 44:370-375.

Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. International Endodontic Journal. 2003; 36:1-11.

Rechenberg RK, Thurnheer T, Zehnder M. Potential systematic error in laboratory experiments on microbial leakage through filled root canals: an experimental study. International Endodontic Journal. 2011; 44:827-835.

Rôças IN, Siqueira JF. Characterization of Microbiota of Root Canal-Treated Teeth with Posttreatment Disease. JCM. 2012; 1721-1724.

Shokouhinejad N, Nekoofar MH, Razmi H, Sajadi S, Davies TE, Saghiri MA, et al. Bioactivity of Endosequence Root Repair Material and Bioaggregate. International Endodontic Journal. 2012; 45:1127-1134.

Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment. J Endod. 2006; 32(2):93-98.

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1998; 85(1):86-93.

Tanomaru-Filho M, Tanomaru JMG, Barros DB, Watanabe E, Ito IY. *In vitro* antimicrobial activity of endodontic sealers, MTA-based cements and Portland cement. *Journal of Oral Science*. 2007; 49(1):41-45.

Walton RE, Torabinejad M. *Principles and Practice of Endodontics*. Third edition. W. B. Saunders Company. 2002

Wang QQ, Zhang CF, Chu CH, Zhu XF. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in saliva and filled root canals of teeth associated with apical periodontitis. *International Journal of Oral Science*. 2012; 4:19-23.

Willershausen I, Callaway A, Briseño B, Willershausen B. *In vitro* analysis of the cytotoxicity and the antimicrobial effect of four endodontic sealers. *Head&Face Medicine*. 2011; 7:15.

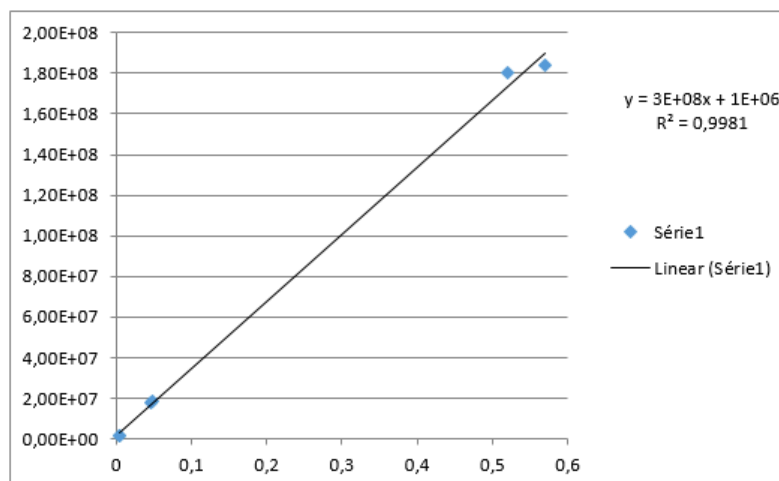
Wu BC, Wei CK, Hsueh NS, Ding SJ. Comparative cell attachment, cytotoxicity and antibacterial activity of radiopaque dicalcium silicate cement and white-coloured mineral trioxide aggregate. *International Endodontic Journal*. 2014; doi:10.1111/iej.12310.

## Anexos

### Anexo 1: Curva de calibração

A determinação do número de ufc/ml numa amostra de turbidez desconhecida, pode ser calculado através da elaboração de uma curva de calibração. Esta curva foi construída através da relação densidade óptica (600 nm) *versus* número de ufc/ml calculado após diluição de uma suspensão inicial.

Com os valores obtidos, estabeleceu-se uma reta de regressão.



**Estudo da relação da densidade ótica com as unidades formadoras de colónias (ufc/ml)**

1º Dia	Column1	2º dia	Column2	3º dia	Column3
Diluições	ufc/ml	Diluições	ufc/ml	Diluições	ufc/ml
0	1,84E+08	0	1,80E+08	0	2,85E+08
1	1,84E+07	1	1,80E+07	1	2,85E+07
2	1,84E+06	2	1,80E+06	2	2,85E+06
3	1,84E+05	3	1,80E+05	3	2,85E+05
4	1,84E+04	4	1,80E+04	4	2,85E+04
5	1,84E+03	5	1,80E+03	5	2,85E+03
				6	285

Anexo 2: Controlo do grupo 1

Legenda	
Positivo	1
Negativo	0

Legenda	
	Controlos negativos
	Controlos positivos

	21/Mai	22/Mai	23/Mai	24/Mai	25/Mai	26/Mai	27/Mai	28/Mai	30/Mai	1/Jun	3/Jun	5/Jun	7/Jun	9/Jun
Dentes	1	2	3	4	5	6	7	8	10	12	14	16	18	20
1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
14	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
29	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
30	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos
	12	4	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1

## Anexo 3: Controlo do grupo 2

Legenda	
Positivo	1
Negativo	0

	27/Mai	28/Mai	29/Mai	30/Mai	31/Mai	1/Jun	2/Jun	3/Jun	5/Jun	7/Jun	9/Jun	11/Jun	13/Jun	15/Jun
Dentes	1	2	3	4	5	6	7	8	10	12	14	16	18	20
31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0